

猪圆环病毒 2 型青海分离株的 分子鉴定及进化分析

赵玉清

(青海省海北藏族自治州畜牧兽医科学研究所, 青海海北 812200)

摘要: 本研究对青藏高原地区猪圆环病毒青海分离株 (PCV2-QH1) 进行了 *Cap* 基因的克隆鉴定及测序分析, 并与我国及其他国家或地区的毒株进行了同源性比较和遗传进化分析。结果显示: PCV2-*Cap* 基因核苷酸序列全长 705 bp, 编码蛋白为 234 个氨基酸, 分子量大小约 28.06 kDa, 为不稳定蛋白, 总体亲水性非常高, 可溶于水; PCV2-*Cap* 蛋白二级结构以无规则卷曲为主, 有多个有效的抗原表位; PCV2-QH1 分离株与其他参考序列的核苷酸和氨基酸序列同源性均在 99% 以上; PCV2-QH1 分离株与 PCV2 美国分离株 (KU697156) 组成一个微小分支, 并与美国毒株、韩国毒株聚在一支, 表明它们之间的亲缘关系最近。本次对青海分离株 PCV2-QH1 的鉴定, 可为我国猪圆环病毒分子流行病学调查提供数据参考。

关键词: 猪圆环病毒; 青海分离株; 分子鉴定; *Cap* 基因; 序列比对; 进化分析

中图分类号: S858.28 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2018) 09-0081-05

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.09.021

Molecular Identification and Evolution Analysis of Porcine Circovirus Type 2 Isolated from Qinghai Province

Zhao Yuqing

(Institute of Animal Sciences and Veterinary Medicine in Haibei Tibetan Autonomous Prefecture of
Qinghai Province, Haibei, Qinghai 812200, China)

Abstract: In this study, *Cap* gene of porcine circovirus Qinghai strain (PCV2-QH1) was cloned and sequenced, meanwhile, the homology comparison and evolution analysis were carried out between PCV2-QH1 and strains from other regions or countries. Results showed that the *Cap* gene was 705 bp in length, encoding 234 amino acids, and the molecular weight of *Cap* protein was 28.06 kDa. The protein was not stable with high hydrophilicity and was soluble in water. The main secondary structure of PCV2-*Cap* protein was irregular coiled-coil, with multiple effective epitopes. The sequence homology of the PCV2-QH1 with other referenced strains were all above 99%. Besides, the PCV-QH1 isolate and the PCV2-USA isolate (KU697156) formed a tiny branch, and PCV-QH1 isolate was clustered together with the USA and South Korea strains, indicating a close relationship. As a conclusion, the study would provide data reference for epidemiological investigation of PCV in China.

Key words: porcine circovirus; virus isolated from Qinghai; molecular identification; *Cap* gene; sequence alignment; evolutionary analysis

猪圆环病毒 (Porcine circovirus, PCV) 属于圆环病毒科 (*Circoviridae*) 圆环病毒属 (*Circovirus*) 的 DNA 病毒, 其基因组为环状单链 DNA 分子, 长度约 1 767 bp, 主要有 *Rep* 和 *Cap* 两个基因完成病毒的复制组装等功能^[1-2]。PCV 有多种血

清型, 如 PCV1、PCV2 和 PCV3 型等。其中: PCV1 无致病性; PCV2 是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Postweaning pigs multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的主要毒株^[3-4]; PCV3 是在美国首先报道发现的新毒株, 能引起猪的皮炎肾病综

合征、繁殖障碍及心脏和多系统的炎症反应，目前在我国河北、福建、广西等多个省份都能检测到，与 PCV1 和 PCV2 处于不同的进化分支，属于新型 PCV^[5-8]。

PCV 主要通过垂直传播（透过胎盘屏障）和水平传播（通过阳性带毒猪的鼻腔液、粪便和尿液等排泄物）而感染其他猪群^[9-10]。血清流行病学调查发现：德国猪群的 PCV 血清抗体阳性率高达 85%，英国为 86%，北爱尔兰为 92%；我国江西、天津、北京、山东、河南、河北、吉林、福建等 8 个省份猪群的抗体阳性率都在 50% 以上^[11-13]。可见，PCV 在全球流行广泛，给养猪业造成了巨大经济损失。

本研究对青海省不同猪场发病猪群样品，通过 PCR 检测 PCV2 *ORF2* 基因，分析基因序列、氨基酸序列和进化树，从而为我国 PCV 感染的诊断、预防控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 病料与毒株

采自青海省 3 个猪场的发病猪群。对表现呼吸困难、咳嗽、精神沉郁、行动迟缓、皮肤苍白、被毛脏乱、厌食消瘦、生长迟缓的猪进行剖检，采集剖检猪的淋巴、脾脏、肾脏和肝脏组织。每个猪场采集样品 6 份，共 18 份样品，用 PBS 液匀浆离心（5 000 r/min，20 min）取上清，-80 °C 保存备用。

1.2 主要试剂与仪器

PCR-Premix Taq™（TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye）和 DNA marker DL 2000：购于宝生物工程（大连）有限公司；粪便基因组 DNA 提取试剂盒：购自天根生化科技（北京）有限公司。其他均为国产常规试剂。PCR 引物合成及 PCR 产物测序，均由苏州金唯智生物科技有限公司完成。主要仪器包括 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像分析系统、离心机、电子天平、蒸汽灭菌器、干燥箱、无菌操作台、微量移液器等。

1.3 分子鉴定

参照粪便基因组 DNA 提取试剂盒说明书，提取粪便基因组 DNA 并以此作为模板。VP2 基因扩增全长片段预期为 702 bp。引物如下：PCV-

CapF: 5'-ATGACGTATCCAAGGAGGC-3' 和 PCV-CapR: 5'-TTAGGGTTTAAGTGGGGGGT-3'。PCR 扩增反应体系（50.0 μL）如下：Premix Taq 25.0 μL，上下游引物（浓度 10.0 μmol/L）各 2.0 μL，模板 DNA 3.0 μL，补充水 18.0 μL。扩增后将 PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳（电压 120 V，时间 30 min），电泳完成后在凝胶成像仪中观察结果并拍照。PCR 阳性产物测序委托金唯智生物科技有限公司完成，采用 Sanger 双脱氧链终止法进行双向测序。测序结果经峰图分析后，在 GenBank 上采用 BLAST 方法（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）进行同源序列搜索；应用 MEGA 5.0 软件和 Clustal Omega 在线软件（<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>）进行核苷酸序列和氨基酸序列同源性分析。

1.4 PCV2-Cap 蛋白特性分析

利用 Prot Param 程序（<http://web.expasy.org/protparam/>）计算 VP2 蛋白的分子量、等电点和氨基酸组成等理化指标；用 SignalP 程序（<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>）和 DAS-TMfilter server 程序（<http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html>）分析其信号肽位点及跨膜结构；用 SOPMA 软件（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html）进行 EM19 抗原蛋白二级结构预测。通过 ABCPred 软件（http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html）对 VP2 蛋白的 B 细胞抗原表位进行预测分析。

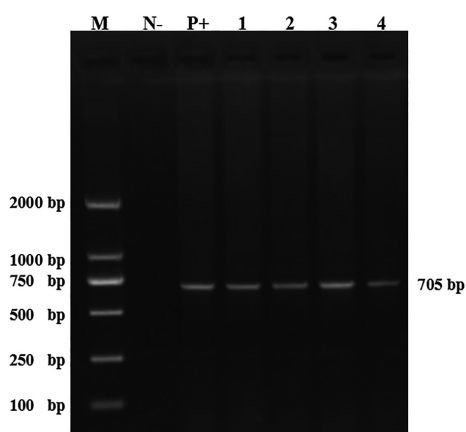
1.5 进化分析

对克隆的 PCV-Cap 基因序列与已发表的 PCV1 和 PCV2 参考株的 Cap 基因序列和氨基酸序列，利用软件中的 Meg Align 功能分别进行比对；利用 MEGA 5.0 软件，采用邻接法（Neighbor-Joining）构建系统发育树；选择 Kimura 2-parameter 模式，进行重复 2 000 次的自举检验，通过系统发育树分析 PCV 分离毒株和不同经典毒株的亲缘关系及进化特点。

2 结果

2.1 分子鉴定

利用基因组 DNA 提取试剂盒, 对病料提取 DNA 后, 基于特异性引物进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳, 可以获得预期大小的片段 (图 1), 并发现有 4 个组织样品呈阳性, 阳性率为 22.2% (4/18)。将 4 个阳性样品进行胶回收测序, 经过序列测定获得完整的 *Cap* 基因核苷酸序列全长为 705 bp, 与 GenBank 参考毒株 (PCV2) 的核苷酸序列同源性均在 99% 以上, 将其命名为 PCV2-QH1 株。



M. DNA 分子质量标准; N-. 阴性对照;
P+. 阳性对照 (疫苗); 1~4. 组织样品

图 1 临床病料样品 PCV-*Cap* 基因 PCR 扩增检测鉴定结果

2.2 PCV2-Cap 蛋白特性

经过 ExpASy 在线系统分析, PCV2-Cap 蛋白长度为 234 个氨基酸, 分子量大小约为 28.06 kDa, 等电点 (pI) 为 10.84; 带正 (Arg + Lys) 负 (Asp + Glu) 电荷氨基酸残基数分别为 41 个和 16 个。假定所有的半胱氨酸都形成二硫键, PCV2-Cap 蛋白在 280 nm 处的摩尔消光系数为 $48\ 360\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 及 0.1% 浓度 (1g/L) 的 *Abs* 值为 1.724; 假定所有的二硫键打开时, 蛋白在 280 nm 处的摩尔消光系数为 $48\ 360\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 及 0.1% 浓度 (1g/L) 的 *Abs* 值为 1.724。PCV2-Cap 蛋白在溶液中的不稳定指数为 56.61, 推测 PCV2-Cap 蛋白

为不稳定蛋白。PCV2-Cap 蛋白的脂肪族指数为 65.30, 亲水性平均系数 (GRAVY) 为 -0.844, 蛋白总体亲水性非常高, 可溶于水。PCV2-Cap 蛋白序列信号肽预测值为 0.182 (cutoff 值为 0.450), 不具有信号肽位点; 软件 DAS-TMfilter server 也显示其不具有潜在的信号肽。PCV2-Cap 蛋白二级结构预测分析发现, α 螺旋比例为 7.26%, β 转角比例为 4.70%, 无规则卷曲比例为 61.54%, 延伸链比例为 26.50%。可见, PCV2-Cap 蛋白的二级结构以无规则卷曲为主。根据 ABC Pred 在线软件预测出抗原表位结果见表 1, 有多个有效的抗原表位。

2.3 PCV-Cap 基因进化关系分析

通过 Clustal Omega 软件, 将分离毒株 PCV2-QH1 的 *Cap* 基因与 GenBank 中相关毒株 *Cap* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行同源性比较, 发现核苷酸同源性均在 99% 以上, 氨基酸序列同源性均为 100%, 无氨基酸突变 (表 2)。进化树分析发现, PCV-QH1 分离株与 PCV2 美国分离株 (KU697156) 组成一个微小分支, 并与其它 PCV2 分离株处于同一个大支上, 从进化角度上鉴定此分离株属 PCV2 株 (图 2)。

3 讨论与结论

PCV 对养猪业造成了巨大危害, 除了引起断奶仔猪多系统衰竭综合征外, 还能造成猪生殖系统紊乱、神经系统病变和呼吸道疾病综合征, 以及肺炎和增生性坏死性肺炎, 也能引起猪皮炎肾病综合征等^[14]。已有研究表明, 猪群除了会同时感染不同基因型的 PCV (PCV1, PCV2a/b) 外, 还会与

表 1 基于 ABCPred 软件分析 PCV2-Cap 蛋白 B 细胞抗原表位结果

抗原位点	序列	得分	抗原位点	序列	得分
73~88	RFNINDFLPPGGGNSNP	0.93	56~71	TVKKTTVRTPSWNVDM	0.83
50~65	SRTIGYTVKKTIVRTP	0.93	135~150	ALTYDPVYVNYSSRHTI	0.83
129~144	FVTKANALTYDPYVNY	0.93	185~200	LRLQTTGNVDHVGLGT	0.82
212~227	NIRITMYVQFREFNLK	0.92	147~162	RHTITQPFSYHSRYFT	0.82
27~42	PWLVHPRHRYRWRKN	0.90	92~107	PFYYRIRKVKVEFWP	0.81
167~182	LDRTIDYFQPNKRNQ	0.89	41~56	KNGIFNTRLSRTIGYT	0.81
156~171	YHSRYFTPKPVLDRTI	0.89	4~19	PRRRFRRRRHRPRSHL	0.81
117~132	GVGSTAVILLDDNFVK	0.89	82~97	PGGGSNPLTVPFYYR	0.78
107~122	PCSPITQGDRGVGSTA	0.87	62~77	VRTPSWNVDMRFININ	0.76
218~233	YVQFREFNLKDPPLNP	0.86	33~48	RHRYRWRKNGIFNTR	0.75
101~116	VKVEFWPCSPITQGDR	0.85	17~32	SHLQILRRRPWLHP	0.75
198~213	LGTAFFENSIYDQDYNI	0.84	205~220	SIYDQDYNIKITMYVQ	0.54

表2 PCV2-QH1 与不同毒株 Cap 基因的核苷酸序列和氨基酸序列的同源性比较 单位: %

参考毒株	核苷酸同源性	氨基酸同源性
PCV2-QH1 Qinghai China	100	100
KU697156 USA	99.0	100
KM624039 Tangshan China	99.0	100
KY810320 South Korea	99.0	100
KY940534 Gansu China	99.0	100
MF616427 Uruguay	99.0	100
MF314301 Thailand	99.0	100
KX960936 Jiangsu China	99.0	100
KX808467 South Korea	99.0	100
KX904953 Jiangsu China	99.0	100
LC310735 Japan	99.0	100

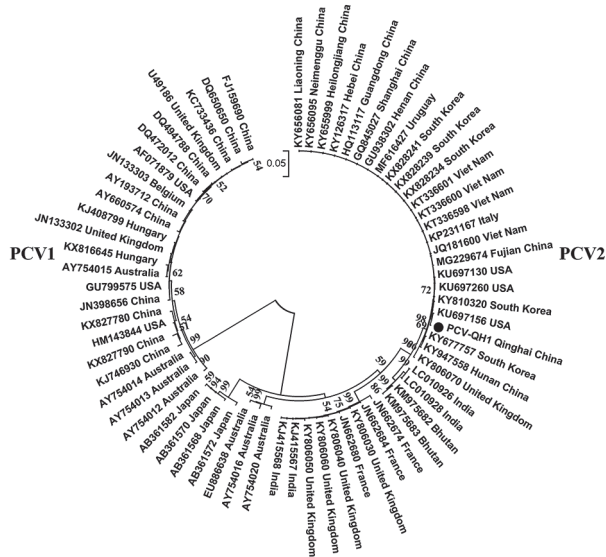


图2 猪圆环病毒 PCV-Cap 基因的进化分析

猪瘟病毒、猪伪狂犬病病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪细小病毒等形成共同感染^[15], 对于属单链 DNA 病毒 PCV 基因组中的基因易造成突变、插入和缺失等变异现象; 同时随着各种疫苗的大规模普遍使用, 新的变异重组毒株可能经常出现。

临床实践中, 从猪组织细胞中纯化分离培养 PCV 较困难, 所以本研究对疑似 PCV 感染组织病料直接进行 DNA 基因组的提取及 PCV 特异性引物的筛选鉴定, 通过测序确定为 PCV2。该方法适用于分子流行病学调查研究, 有助于基因和蛋白质比较及遗传进化分析, 同时可节省时间。

本研究表明, PCV2-Cap 基因核苷酸序列与不同国家或地区的同源性均在 99% 以上, 而蛋白质序列同源性均为 100%, 无氨基酸突变。PCV2-Cap

蛋白为病毒的衣壳蛋白, 是主要的结构蛋白, 也是主要的抗原表位。本地区 PCV 的 Cap 蛋白的氨基酸序列无突变, 说明使用市场通用疫苗可收到良好的免疫效果。

同时, 本研究对不同地区的 PCV 分离株进行了序列比较分析, 并绘制了系统进化树。结果表明, 青海株 (PCV-QH1) 与美国 3 株毒株、韩国毒株聚在一支, 表明它们之间的亲缘关系最近; 我国不同地区的毒株聚在一起, 同时与韩国毒株亲缘关系较近。欧洲毒株 (法国和英国) 与印度毒株亲缘关系较近, 澳大利亚毒株和日本毒株分别聚在一起, 亲缘关系较近。在进化角度上讲, 中国株与韩国株和美国株的亲缘关系较近, 说明中国株 PCV 病毒不是从单一的祖先进化而来的。这表明中国株与我国的国际进口引种贸易相关, 但尚待进一步研究。本次对青海 PCV 分离株的 Cap 基因序列、蛋白氨基酸序列和抗原表位及系统进化的研究, 可为我国 PCV 分子流行病学调查提供数据参考, 同时提示猪场应按照疫苗免疫保健计划进行疫苗免疫预防。

参考文献:

- [1] 张应国, 张文东, 宋建领, 等. 猪圆环病毒基因组结构及其分子特征研究进展[J]. 动物医学进展, 2006(7): 6-10.
- [2] 代振江, 王伟丞, 曾智勇, 等. 猪圆环病毒基因组结构与功能研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2016, (3): 151-154.
- [3] 张志, 孙启峰, 张美晶, 等. 我国猪圆环病毒病的流行病学分析[J]. 中国动物检疫, 2015, 32(11): 6-10.
- [4] 王宪文, 王丽荣, 姚四新, 等. 猪圆环病毒病的流行诊断和控制进展[J]. 中国兽医杂志, 2012, (4): 60-62.
- [5] 刘建奎, 魏春华, 陈小燕, 等. 福建省新发猪圆环病毒 3 型流行病学调查及遗传变异分析[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(2): 160-163.
- [6] 庞笑语, 建昌, 韩庆安, 等. 河北省猪群中检出猪圆环病毒 3 型[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(11): 70-73.
- [7] 贺会利, 李军, 潘艳, 等. 广西首例猪圆环病毒 3 型的发现及其衣壳蛋白序列分析[J]. 南方农业学报, 2017, 48(8): 1499-1503.

(下转第 111 页)

(上接第 84 页)

- [8] 湛洋, 王东亮, 王乃东, 等. 猪圆环病毒 3 型检测及其 Cap 结构序列和抗原性预测分析[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48 (6): 1076-1084.
- [9] 冯志新, 范伟兴, 李晓成, 等. PMWS 病猪猪圆环病毒 2 型全基因组序列分析[J]. 中国病毒学, 2004 (5): 26-29.
- [10] 马相如, 陈焕春, 肖少波, 等. 猪圆环病毒 (PCV) 序列分析与进化[J]. 中国兽医学报, 2004 (2): 105-108.
- [11] 李瑞香. 规模化猪场猪圆环病毒 2 型的血清流行病学调查[J]. 动物医学进展, 2017 (3): 129-132.
- [12] 周景明, 贾蕊, 刘红亮, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的纯化与鉴定[J]. 动物医学进展, 2017 (9): 23-27.
- [13] 刘梦志, 陈欣, 金淑秀, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF3 蛋白的表达及抗原性鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2017 (10): 55-58.
- [14] 钱八虎, 费楚林, 孙金金, 等. 猪圆环病毒病诊断技术研究进展[J]. 兽医导刊, 2014 (S1): 164-166.
- [15] 王宪文. 猪圆环病毒 2 型疫苗研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41 (4): 252-255.

(责任编辑: 朱迪国)